

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 29

Variabilidade de *Pirycularia grisea* em arroz de terras altas

Gisele Barata da Silva
Anne Sitarama Prabhu
Marta Cristina de Filippi

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Arroz e Feijão

Rodovia GO 462 - Km 12 - Zona Rural - Caixa Postal 179
75375-000 Santo Antônio de Goiás, GO

Fone: (62) 3533 2123

Fax: (62) 3533 2100

www.cnpaf.embrapa.br

sac@cnpaf.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Carlos Agustín Rava*

Secretário-Executivo: *Luiz Roberto Rocha da Silva*

Membro: *Leonardo Cunha Melo*

Maria José Del Peloso

Supervisor editorial: *André Ribeiro Coutinho*

Revisão gramatical: *André Ribeiro Coutinho*

Normalização bibliográfica: *Ana Lúcia D. de Faria*

Capa: *Sebastião José de Araújo*

Editoração eletrônica: *Fabiano Severino*

1ª edição

1ª impressão (2007): 500 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Arroz e Feijão

Silva, Gisele Barata da.

. Variabilidade de *Pyricularia grisea* em arroz de terras altas / Gisele Barata da Silva, Anne Sitarama Prabhu, Marta Cristina de Filippi. - Santo Antônio de Goiás : Embrapa Arroz e Feijão, 2007.

. 24 p. - (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Arroz e Feijão, ISSN 1678-9601 ; 29)

. 1. Arroz - Brusone. 2. Arroz - Doença de planta. I. Prabhu, Anne Sitarama. II. Filippi, Marta Cristina de. III. Título. IV. Embrapa Arroz e Feijão. V. Série.

CDD 633.1894 (21. ed.)

© Embrapa 2007

Sumário

Resumo	5
Abstract	7
Introdução	9
Material e métodos	11
Coleta dos isolados	11
Genótipos utilizados	12
Teste de patogenicidade	12
Extração e amplificação de DNA	13
Análises dos dados	14
Resultados	15
Distribuição de patótipos	15
Conclusões	21
Referências	22

Variabilidade de *Pirycularia grisea* em arroz de terras altas

*Gisele Barata da Silva*¹

*Anne Sitarama Prabhu*²

*Marta Cristina de Filippi*³

Resumo

A estrutura genética e fenotípica de *Magnaporthe grisea* foi determinada entre e dentro populações, provenientes de folhas e panículas de duas cultivares de arroz de terras altas. Para estabelecer isolados monospóricos de folhas e panículas foram coletadas amostras em oito lavouras comerciais de arroz, quatro da cv. BRS Bonança e quatro da cv. BRS Primavera, no estado de Goiás, durante duas safras consecutivas. As raças IB-41 e IB-9 foram as predominantes entre os isolados de folhas e panículas de BRS Bonança e IF-1 nas populações de Primavera. De 35 e 27 raças identificadas dentre os isolados obtidos de BRS Bonança e Primavera, 42,8% e 66,6% foram comum em ambas as subpopulações de folha e panícula, respectivamente. Um total de 15 raças não encontradas em folhas foi detectado em baixa frequência em panícula de BRS Bonança. A análise de variância da virulência fenotípica, com base em 32 genótipos, mostrou elevada variabilidade dentro da subpopulação de cada cultivar. O efeito de cultivar sobre a estrutura da população foi significativo. Não existiu mudança significativa no padrão de virulência dos isolados de folhas e panículas, independente do local e cultivar. A caracterização molecular dos isolados foi realizada por Rep-PCR com dois primers da sequência Pot 2. A

¹ Engenheira Agrônoma, Dr. em Fitopatologia. Universidade Federal Rural do Amazônia (UFRA), Laboratório Fitossanidade sanidade. Av. Pres. Tancredo Neves, 2501, Terra firme 66077-530. Belém, PA. gisele.barata@ufra.edu.br

² Biólogo, PhD em Fitopatologia. Embrapa Arroz e Feijão. Rod. GO 462, Km 12. 75375-000. Santo Antônio de Goiás, GO. prabhu@cnpaf.embrapa.br

³ Engenheira Agrônoma, PhD em Fitopatologia. Embrapa Arroz e Feijão. Rod. GO 462, Km 12. 75375-000. Santo Antônio de Goiás, GO. Cristina@cnpaf.embrapa.br

análise genética mostrou a presença de 103 perfis de BRS Bonança e 49 de Primavera. A migração das raças de folhas para panículas dentro de cada campo foi 70,8% e 36,6% para Primavera e BRS Bonança, respectivamente. A análise por Rep-PCR dos 538 isolados de *M. grisea* mostrou elevada diversidade genotípica nas populações do patógeno de folha e de panículas.

Termos para indexação: *Oryza sativa*, virulência, Rep-PCR, brusone

Variability of *Piricularia grisea* in upland rice

Abstract

Genetic and phenotypic structure of Magnaporthe grisea, both among and within the populations, retrieved from leaves and panicles of two upland rice cultivars was determined. For establishing monoconidial isolates of M. grisea, leaf and panicle blast samples were collected from eight farmers' fields, four from cv. BRS Bonança and four from cv. Primavera, in the State of Goiás, Brazil, during two consecutive rice growing seasons. The pathotypes IB-41 and IB-9 were predominant in both leaf and panicle isolates of BRS Bonança and IF-1 in populations of Primavera. Of the 35 and 27 pathotypes identified among isolates obtained from cvs. BRS Bonança and Primavera, 42.8% and 66.6% were common in both leaf and panicle subpopulations, respectively. A total of 15 pathotypes which were not in leaf were found in low frequency in panicles of cv. BRS Bonança. The analysis of variance of phenotypic virulence data based on 32 genotypes showed high variability within population of each cultivars. The effect of cultivar on population structure was significant. There was no significant change in virulence pattern of isolates from leaves and panicles, independent of collection site and cultivar. The molecular characterization of isolates was done employing the rep-PCR analysis with two primer sequences from Pot2. The genetic analysis showed the presence of 103 haplotypes of cv BRS Bonança and 49 of cv Primavera. The migration of pathotypes from leaves to panicles in each field was 70.8% and 36.6% for the cvs. Primavera and BRS Bonança, respectively. Rep-PCR analysis of 538 isolates of M. grisea showed a high genotypic diversity in both leaf and panicle pathogen population. There was no correlation between virulence pattern and molecular analysis.

Index terms: Oryza sativa, virulence, Rep-PCR, blast

Introdução

A brusone causada por *Magnaporthe oryzae* Hebert (Barr) [= *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc.] é a doença economicamente mais importante da cultura do arroz de terras altas. Embora afete toda a parte aérea da planta, as fases mais críticas são as que ocorrem nas folhas entre o 25º e o 35º dia após o plantio e a brusone nas panículas nas fases de grão leitoso a pastoso. O patossistema arroz-brusone pode ser dividido em dois subpatossistemas, brusone nas folhas e nas panículas (TENG, 1994).

Prabhu et al. (2003), estimou que a perda média na produtividade, causada pela incidência da brusone, nas cultivares de arroz de terras altas BRS Bonança, Canastra, Caiapó e Primavera foi de 59,6%. As cultivares de arroz de terras altas, Primavera e BRS Bonança, amplamente plantadas no estado de Goiás variam em grau de suscetibilidade sendo que nas panículas a doença já causou 42,7% de espiguetas vazias na cultivar Primavera e 11% em BRS Bonança, em condições de campo (ARAÚJO et al., 2004). A suscetibilidade da cultivar Primavera vem aumentando com o aumento da área plantada desde seu lançamento em 1996.

O sucesso no manejo da brusone através de cultivares melhoradas geneticamente para resistência é limitado pela freqüente perda da resistência em condições de campo, comumente atribuída ao aparecimento de novos patótipos, ao aumento da taxa de multiplicação de isolados virulentos, aumento do inóculo em área plantada, freqüência elevada de mutação em isolados avirulentos para virulentos (KIYOSAWA, 1982; BONMAN et al., 1992), e falha nos métodos de seleção de genótipos resistentes (CORREA-VICTORIA; ZEIGLER, 1993). Diferentes estratégias de melhoramento devem ser adotadas para aumento da durabilidade da resistência, e, estas requerem conhecimentos sobre a estrutura da população do patógeno.

A estrutura da população de um patógeno refere-se à intensidade das variações genética e fenotípica no tempo e no espaço, podendo ser influenciada pela cultivar de origem, pelo local, tamanho da área plantada e isolamento da área plantada com uma determinada cultivar.

Populações de *P. grisea* são consideradas complexas e compostas por grande número de patótipos. Estes são identificadas pela reação, de um determinado isolado monospórico, em um conjunto de oito cultivares padronizadas como diferenciadoras internacionais (LATTERELL et al., 1954; LING; OU, 1969) e em um conjunto de diferenciadoras brasileiras. Prabhu et al. (2002a) estudaram a

diversidade patogênica de 85 isolados de *P. grisea*, coletados de 14 cultivares de arroz de terras altas, plantadas em campos experimentais, durante um período de cinco anos consecutivos. Foram detectados 11 patótipos, utilizando-se as diferenciadoras internacionais, e os predominantes foram IB-9 (56,4%), IB-1 (16,4%) e IB-41 (11,8%). Utilizando-se as diferenciadoras brasileiras foram identificados 26 patótipos e os predominantes foram BB-21(28,2%) e BB-41(17,6%). Os patótipos BB-21 e a IB-33 foram os mais freqüentes entre os isolados coletados da cultivar BRS Bonança. Dos isolados provenientes de 'Primavera', BD-16 foi o predominante, enquanto a freqüência dos patótipos detectados pelas diferenciadoras internacionais detectou a ocorrência do grupo IC (IC-9, IC-1 e IC-25).

A análise da estrutura genética de uma determinada população de *P. grisea* utilizando-se marcadores moleculares, quando analisados juntamente com seu espectro de resistência, em um referido conjunto de cultivares, pode revelar aspectos da dinâmica evolucionária de *P. grisea* em condições de campo (KANG; LEE, 2000). A estrutura genética da população de *P. grisea* tem sido estudada utilizando-se marcadores moleculares, os quais incluem RFLP (Polimorfismo baseado no comprimento do fragmento de restrição), RAPD (Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso), Rep-PCR (reação em cadeia da polimerase, amplificando regiões espaçadoras entre regiões repetitivas) e microsatélites. Diversos estudos demonstraram que os isolados de *P. grisea* podem ser agrupados em linhagens geneticamente distintas (HAMER,1991; LEVY et al., 1993; KUMAR et al.,1999, FILIPPI; PRABHU, 2001; PRABHU et al., 2002b). A análise da virulência de cinco grupos, formados pela distância genética determinada por marcadores RAPD (RG1-RG5), testados em 20 genótipos de arroz, os quais representavam no mínimo 15 genes de resistência, revelou que não existe genes de resistência que atuam contra todos os grupos de RAPD presente em uma população de *P. grisea* de arroz (PARK et al., 2003; RATHOUR et al., 2004).

Até a presente data, a maioria dos estudos realizados em diversidade de populações de *P. grisea*, com exceção de poucos, limitam-se a isolados provenientes da folha. Han et al. (1997) demonstraram que a migração de patótipos de *P. grisea* das folhas para as panículas de arroz, num mesmo campo, foi em torno de 30% a 50%, ou seja, grande parte dos patótipos detectados na fase vegetativa também colonizaram a mesma área, na fase de emissão de panícula e, a estrutura da população do patógeno foi afetada apenas pelo genótipo do hospedeiro, predominando patótipos diferentes em cada cultivar.

A maioria dos estudos de estrutura da população de *P. grisea* realizados com isolados coletados em campos experimentais, instalados em pequenas áreas de produção nas montanhas do Himalaia, resultou na identificação de um grande número de linhagens.

O objetivo do presente trabalho foi estudar a variabilidade da população de *P. grisea* provenientes de folhas e panículas, coletados em lavouras comerciais, distantes geograficamente, plantadas com as cultivares de arroz de terras altas, BRS Bonança e Primavera.

Material e métodos

Coleta dos isolados

Isolados de *P. grisea* foram coletados em oito lavouras comerciais das cultivares de arroz de terras altas, BRS Bonança e Primavera, em cinco municípios do Estado de Goiás, em dois anos consecutivos. As lavouras selecionadas para as coletas estavam isoladas de outras lavouras de arroz por uma distância mínima de 50 km, exceto na lavoura dois da cultivar BRS Bonança em que havia uma lavoura da cv Primavera a 200 m de distância. Inspeções regulares nas lavouras de arroz foram feitas para verificar a presença da brusone nas folhas e nas panículas. As amostras de folhas e panículas com lesões esporulativas foram coletadas na fase vegetativa, de 30 a 50 dias, e de enchimento de grãos, de 80 a 90 dias, respectivamente, após o plantio. Em cada lavoura as amostras foram obtidas em uma área de aproximadamente um hectare, as quais foram pré-marcadas com cinco estacas, sendo quatro nas extremidades e uma no centro, separadas em aproximadamente 100 m de distância. A amostra foi composta de no mínimo 50 folhas por ponto pré-marcado e 100 panículas com lesões esporulativas em cada lavoura. Os isolados monospóricos foram estabelecidos a partir de um conídio por lesão e duas a três lesões por folha e os isolados de panículas foram, em sua maioria, um conídio por panícula. A coleção total foi composta de 2.082 isolados que foram mantidos em papel de filtro esterilizados e acondicionados em sacos de papel e guardados em freezer (-20°C). Para a condução dos testes de patogenicidade e variabilidade genética foi realizado um sorteio para compor uma amostra de 712 isolados. Foi realizado um sorteio dentre os 2.082 isolados por lavoura e estágio fenológico e selecionado 800 isolados para os teste, porém obteve-se resultados de 712 isolados para o teste de virulência e 514 isolados para os estudos de variação genética. O número total de isolados de folhas e de panículas por cultivar, local e ano encontra-se na Tabela 1. O número de isolados utilizados para os teste de virulência e 514 isolados para os estudos de variação genética.

Tabela 1. Número de isolados monóspóricos de *Piricularia grisea* estabelecidos por lavoura, locais e anos de coleta das cultivares de arroz de terras altas BRS Bonança e Primavera coletados no Estado de Goiás.

Lavouras	Municípios	Anos	Nº de isolados estabelecidos	
			Folha	Panicula
BRSBonança (B1)	Piracanjuba	2002	256	84
BRSBonança (B2)	Piracanjuba	2002	147	125
BRSBonança (B3)	Bela Vista	2003	110	80
BRSBonança (B4)	Uruana	2003	53	70
Primavera (P1)	Santo Antônio de Goiás	2002	311	212
Primavera (P2)	Santo Antônio de Goiás	2002	220	195
Primavera (P3)	Bela Vista	2003	100	90
Primavera (P4)	Ceres	2003	80	95
Total	-	-	1.167	915

Genótipos utilizados

Foram utilizados 32 genótipos incluindo as cultivares diferenciadoras internacionais ('Dular', 'Kanto 51', 'NP125', 'Raminad Str 3', 'Usen', 'Zenith', 'Caloro' and 'Shatiao-tsao'), as cultivares diferenciadoras brasileiras ('Carajás', 'Confiança', 'Maravilha', 'Primavera', 'Progresso', 'Caiapó', 'IAC-47', 'IAC-201'), cultivar BRS Bonança, seis linhas quase isogênicas da cultivar 'IAC-25'(CNA-2006, CNA-8198, CNA-8199, CNA-8210, CNA-8212, CNA-8209), cultivar IAC-25 e as cultivares diferenciadoras japonesas (Shin-2, Aichi- Asahi, Ishikarishiroke, Tsuyake, Fukunishiki, Yashiro Mochi, Pi-4, Toride-1). Estes genótipos foram semeados em bandejas de plástico (15 x 30 x 10 cm) contendo 3 kg de solo adubado com NPK (5g de 5-30-15 + Zn e 3g de sulfato de amônio por 3 kg de solo). Foram semeados 16 genótipos por bandeja (10 a 12 sementes/cultivar por linha). A adubação de cobertura com nitrogênio foi feita aos 18 dias após a semeadura com 2 g de sulfato de amônio por bandeja.

Teste de patogenicidade

Os 712 isolados de *P. grisea* foram pré-multiplicados em placas de Petri contendo meio de cultura BDA (Batata-dextrose-agar) e incubados por cinco dias em temperatura ambiente. Para a produção de esporos, pedaços de micélio foram transferidos para placas de Petri contendo meio de arroz (arroz com casca triturado-dextrose-extrato de levedura-ágar) e incubados a 25°C por sete dias. Após este período, o micélio superficial foi raspado com bastão em condições assépticas e a placas foram deixadas com as tampas abertas e cobertas com um pano branco, sob luz fluorescente por três dias.

As inoculações foram feitas em plantas com 21 dias de idade que apresentavam três folhas abertas. As plantas foram inoculadas com uma suspensão de conídios (3×10^5 conídios.mL⁻¹) utilizando De Vilbiss acoplado a um compressor. As plantas inoculadas foram incubadas por 24 horas em câmara úmida sob temperatura variando de 20°C a 24°C. Após este período foram mantidas em casa de vegetação em temperatura variando entre 25°C e 28°C, e umidade acima de 80%. A reação da brusone nas folhas foi avaliada sete dias após a inoculação considerando-se apenas as reação, no hospedeiro, suscetível ou resistente. As plantas com os tipos de infecção 0 a 3 foram considerados resistentes e 4 a 9 suscetíveis, com base numa escala de doença de 0-9 (INTERNATIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE, 1988).

As plantas pulverizadas com água foram mantidas como testemunha para verificar a inexistência de contaminação no processo de inoculação. As inoculações foram repetidas quando as plantas da testemunha apresentaram sintomas da brusone ou quando os isolados de *P. grisea* não causaram sintomas nas cultivares BRS Bonança ou Primavera (FILIPPI; PRABHU, 2001).

Extração e amplificação de DNA

Os 514 isolados de *P. grisea* foram cultivados em 70 mL de meio de cultura líquido (10 g de dextrose suplementada com 2 g extrato de levedura por litro) em frascos Erlenmeyer (125 mL) mantidos por quatro dias, sem agitação e em local escuro, em temperatura ambiente e por 10 dias com agitação giratória (90 rpm) sob as mesmas condições anteriores. A extração de DNA foi realizado pelo método do CTAB modificado de Doyle e Doyle (1987). Aproximadamente 40 mg de micélio, liofilizado e macerado em nitrogênio líquido, foi incubado em 750 µl de tampão de extração (5,0% CTAB; 5,0 M de NaCl; 0,5% de EDTA; 1,0 M de Tris-HCl (pH 8.0); 10% de PVP e 0,1% de β-mercaptoetanol), a 65°C, durante 50 minutos. A purificação dos ácidos nucléicos foi feita adicionando 750 µl de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). O DNA foi precipitado com 400 µl de isopropanol gelado, lavado com etanol (70%) e etanol absoluto, seco à vácuo, ressuspensão em 300 µl de tampão TE (10 mM Tris- HCl, pH 8.0; 1.0 mM EDTA) contendo 10 mg/ml de RNAase e incubado a 65°C por 10 minutos. O DNA foi precipitado, secado em vácuo e ressuspensionado em tampão TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1.0 mM EDTA) e incubado a 65°C durante 10 minutos. A qualidade do DNA foi verificada em gel de agarose (1%) e a concentração de DNA foi determinada em fluorômetro (Dyna Quant 200 Hoefer), e ajustada para 10 ng/µl.

A caracterização molecular dos isolados de *P. grisea* foi feita pelo protocolo descrito por George et al. (1998) modificado. As seqüências de oligonucleotídeos são baseadas na seqüência do *primer* do elemento repetitivo *Pot 2* (EMBL número de acesso Z33638), um transposon repetido invertido com aproximadamente 100 cópias no genoma do fungo *P. grisea* (KACHROO et al., 1994). Os dois *primers* (*Pot2-1* 5' CGGAAGCCCTAAAGCTGTTT 3' e *Pot2-2* 5' CCCTCATTCGTACACGTTT 3') foram desenhados de cada extremidade do *Pot 2* na orientação oposta, tal que as extremidades 3' são dirigidas do externo de cada elemento. Os dois *primers*, cujas seqüências são internas ao 43-bp, a extremidade do transposon repetido invertido amplifica as seqüências flanqueando, em ambos os lados do elemento repetitivo, fragmentos gerados que medem as seqüências intervenientes. Cada reação de amplificação de 50 µl incluiu 5 µl de 10 ng de DNA, 5 µl de tampão 10 X de reação (200 mM Tris - HCl, pH 8,4 e 500 mM de KCl), 1,5 µl de 50 mM MgCl₂; 0,5 µl de dNTP (10 mM de cada dATP, dGTP, dCTP e dTTP), 1,25 µM de cada *primer*, 0,5 unidades de Taq polimerase, sobrepostas com 50 µl de óleo mineral para prevenir evaporação. A amplificação enzimática foi feita em um termociclador (M.J. Research, Inc.), programado para 30 ciclos. O processo de desnaturação foi de 2,5 min a 95°C, seguido de quatro ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 62°C (anelamento do *primer* ao DNA molde) e 1 min a 65°C (extensão dos *primers*); 26 ciclos de 30 segundos a 94°C (desnaturação do DNA), 1 minuto a 62°C (anelamento do *primer* ao DNA molde) e 10 minutos a 65°C (extensão dos *primers*), seguido de extensão final por 15 minutos a 65 °C.

Os fragmentos gerados por amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose (0,5%) + synergel (0,75%) em tampão TBE [Trisborato (90 mM) e EDTA (2 mM)] contendo 5 µl de uma solução de brometo de etídio a 1%. Posteriormente, os géis foram fotografados sob luz ultra violeta, utilizando-se o sistema de fotodocumentação Eagle Eye II (Stratagene).

Análises dos dados

O número de patótipos, com base nas diferenciadoras brasileiras e internacionais, o desvio padrão da freqüência e o patótipo predominante foram calculados para cada lavoura, tanto para isolados provenientes de folhas quanto de panículas. A diversidade de patótipos foi estimada pelo índice de Simpson (PIELOU, 1975), $HS = 1 - [ni(ni - 1) / N(N-1)]$, onde ni é o número de indivíduos do patótipo i e N o tamanho da amostra.

O coeficiente de virulência dos isolados de *P. grisea* foi calculado para cada subpopulação de folha e panícula, de ambas as cultivares, considerando a reação da

brusone obtida em 32 genótipos. O padrão de virulência dos isolados obtidos em 32 genótipos foi analisado com base na similaridade do tipo de reação entre isolados.

Uma matriz binária indicando reação compatível (1) e reação incompatível (0) de cada isolado foi utilizada para construir uma matriz de similaridade entre todos os pares de isolados de acordo com o coeficiente de Jaccard (CLIFFORD; STEPHENSON, 1975).

As divergências estatísticas foram estimadas pela análise hierárquica de variância molecular (AMOVA) (EXCOFFIER et al., 1992) com os dados binários fenotípicos. A variância total foi dividida em três níveis para analisar a porcentagem de variação existente entre os grupos BRS Bonança x Primavera e Folha x Panícula e entre populações dentro do grupo e dentro de populações, utilizando o programa Arlequin versão 2001 (SCHNEIDER et al., 2000).

Com o objetivo de analisar os padrões de variação espacial estimou-se o coeficiente de correlação de Pearson (r) entre a matriz de diversidade de virulência fenotípica, estimada pelo método de isolamento de Slatkin (SLATKIN, 1993) e a matriz de distância geográfica entre as populações dentro de cada cultivar, utilizando-se o programa NTSYS-pc (ROHLF, 1993). A significância dessa correlação matricial foi testada utilizando-se a estatística Z de Mantel dada por $Z = \frac{r}{\sqrt{\frac{1}{n(n-1)}}}$; onde x e y são elementos das matrizes X e Y a serem comparadas. Atualmente, a maneira mais usual de testar a significância do teste de Mantel é através de permutas aleatórias, gerando uma distribuição nula à qual o valor da estatística Z é comparado (DINIZ FILHO, 1998). Nesse trabalho, 5000 permutações aleatórias foram utilizadas para se testar a significância das correlações matriciais.

Resultados

Distribuição de patótipos

Cultivares diferenciadoras brasileiras

Foi identificado um total de 95 patótipos brasileiros pertencentes a nove grupos, nos testes realizados com 712 isolados coletados em oito lavouras comerciais das cultivares de arroz BRS Bonança e Primavera durante dois anos consecutivos (Tabela 2). Embora o grupo predominante tenha sido o BB, o maior número de isolados pertenceram ao grupo BD. Nas lavouras de BRS Bonança foram detectadas 69 raças em 183 isolados de folhas e 50 raças em 180 isolados de panículas. Nas lavouras de 'Primavera' foram detectadas 13 raças em 183 isolados de folha e 19 raças em 166 isolados de panícula.

Tabela 2. Número de isolados pertencente a cada grupo de patótipos identificados com as diferenciadoras brasileiras, número total de raças por grupo das subpopulações de *Piricularia grisea* isolados de folhas e de panículas das cultivares BRS Bonança e Primavera, coletadas em oito lavouras de arroz de terras altas, em dois anos.

Grupos de raça	Nº total de raças	BRS Bonança								Primavera							
		Folha (n = 183)				Panícula (n = 180)				Folha (n = 183)				Panícula (n = 166)			
		B1 ¹	B2	B3	B4	B1	B2	B3	B4	P1	P2	P3	P4	P1	P2	P3	P4
BA	13	2	2	6	4	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-
BB	41	33	27	41	17	15	28	26	18	1	1	1	2	2	-	2	2
BC	17	4	6	1	9	1	6	4	-	-	-	-	2	-	2	3	2
BD	13	3	2	-	2	4	4	7	0	43	42	38	34	37	28	26	34
BE	5	2	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
BF	2	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-
BG	2	1	2	-	3	2	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BH	1	-	2	-	1	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BI	1	3	6	-	1	22	1	8	-	-	-	-	-	5	6	11	4
9	95	48	49	48	38	50	44	47	39	48	46	45	44	44	38	42	42

¹ identificação da lavoura.

As cultivares diferenciadoras brasileiras ‘Confiança’, ‘Maravilha’ e ‘Primavera’ foram suscetíveis e ‘Carajás’, ‘Progresso’, ‘Caiapó’, ‘IAC-47’ e ‘IAC-21’ foram resistentes ao patótipo BB-16. Resultados similares foram obtidos em estudos anteriores com isolados obtidos de campos experimentais durante 3 anos, onde quatro de cinco isolados foram BD-16 (PRABHU et al., 2002b).

O patótipo BB-21 foi identificada em 25 dos 45 isolados obtidos de lavouras da Cultivar BRS Bonança em Bela Vista na safra 2002/2003. Por outro lado nas outras três lavouras de BRS Bonança, o numero de patótipos variou entre 14 a 21, indicando elevada variabilidade patogênica de *P. grisea*.

Cultivares diferenciadoras internacionais

Dos 170 isolados coletados da cv Primavera 22 patótipos foram identificados e os predominantes foram IF-1, ID-9 e IC-9 (Tabela 3). Enquanto nos testes conduzidos com 136 isolados provenientes das lavouras de BRS Bonança 19 patótipos foram detectados e os mais freqüentes foram IB-41 e IB-9. Prabhu et al. (2002b) identificaram nos campos comerciais da cv BRS Bonança dois patótipos em cinco isolados: quatro deles pertenciam ao patótipo IB-9 e apenas um ao IB-33.

Tabela 3. Distribuição dos patótipos, identificados com as diferenciadoras internacionais, de *Piricularia grisea* isolados de folhas e panículas, das cultivares BRS Bonança e BRS Primavera, coletadas em quatro lavouras comerciais de arroz de terras altas, em dois anos.

Patótipo	BRS Bonança								BRS Primavera							
	Folha				Panícula				Folha				Panícula			
	B1	B2	B3	B4	B1	B2	B3	B4	P1	P2	P3	P4	P1	P2	P3	P4
IA-41	1	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IA-113	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IA-122	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IB-1	1	-	2	4	-	3	1	1	-	1	3	-	1	-	3	2
IB-9	8	7	26	7	4	10	15	8	2	1	1	-	-	1	-	-
IB-10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
IB-13	-	-	3	1	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IB-17	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	4	-	-	-	2	1
IB-18	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-
IB-21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
IB-25	-	-	-	-	-	-	1	2	-	1	1	-	1	-	-	1
IB-33	2	3	1	8	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
IB-37	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IB-41	22	32	13	8	12	28	8	10	1	2	-	-	3	2	1	-
IB-42	-	-	-	-	-	-	1	2	-	-	-	-	-	-	-	-
IB-43	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IB-45	3	2	3	1	1	1	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IB-46	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IB-49	-	-	-	1	-	-	-	1	1	-	5	-	-	-	2	-
IB-50	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
IB-57	3	1	-	-	1	1	1	1	1	3	3	1	1	-	-	-
IB-58	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IB-61	5	-	-	1	6	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IB-63	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IC-1	-	-	-	1	-	-	1	1	3	-	2	-	1	-	1	5
IC-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
IC-9	-	-	-	-	2	-	3	-	10	4	2	5	-	1	4	4
IC-17	-	1	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-	-	-	-	1
IC-25	-	-	-	-	-	-	1	1	3	4	3	5	4	4	5	7
IC-26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-
IC-29	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
ID-1	-	-	-	1	-	-	-	-	1	2	1	-	-	-	-	-
ID-9	-	-	-	-	3	-	1	-	15	11	-	3	11	3	3	2
ID-10	-	-	-	-	-	-	-	-	10	1	-	-	-	-	-	1
ID-13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-
ID-16	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IE-1	-	-	-	1	-	-	-	2	-	1	1	-	1	2	16	-
IE-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-
IF-1	-	-	-	1	5	-	7	2	-	12	11	26	17	2	-	14
IF-2	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1	1	-	1	1
IG-1	-	-	-	1	7	-	-	-	1	-	2	-	-	-	1	-
IG-2	-	-	-	-	1	-	-	-	-	2	-	-	1	-	-	-

Trinta patótipos internacionais foram identificados nos campos de Primavera e BRS Bonança. Considerando as quatro lavouras de BRS Bonança, BB-21 e foram patótipos predominantes com 15,9% e 17,8% de freqüência para os isolados coletados nas folhas e nas panículas (Figura 1A). As populações de *P. grisea* de lavouras da cultivar Primavera mostraram baixa diversidade de patótipos prevalecendo o patótipo BD-16 com 73,8% de freqüência entre os isolados de folha e 67,5% dos isolados provenientes de panículas (Figura 1B).

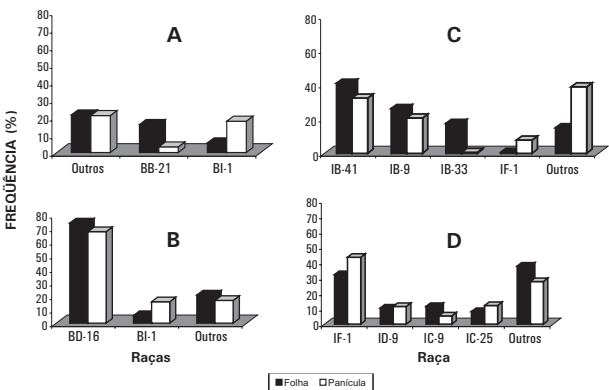


Fig. 1. Freqüência de patótipos, com base nas diferenciadoras brasileiras (A e B) e internacionais (C e D), de *Piricularia grisea* provenientes de folha e panículas coletadas em quatro lavouras de arroz de terras altas, cultivares BRS Bonança (A) e Primavera (B).

Variação fenotípica

A variação da virulência, em porcentagem, entre grupos de isolados provenientes de folha e panícula, entre isolados de diferentes cultivares, entre isolados de uma mesma cultivar em diferentes locais e dentro de cada lavoura foi analisado os dados de virulência fenotípica de 712 isolados de *P. grisea* em 32 genótipos de arroz (Tabela 4).

Tabela 4. Distribuição hierárquica da virulência entre populações de *Piricularia grisea* (estádio fenológico e cultivar) das cultivares BRS Bonança e Primavera.

Estádio fenológico ^a					Cultivar ^c				
Porcentagem de variação total ^b					Porcentagem de variação total ^b				
População	Tamanho da amostra	Entre cultivares	Entre lavouras dentro de cultivar	Dentro cultivares	População	Tamanho da amostra	Entre folha e panícula	Entre isolados de folha dentro de folha e panícula	Dentro de lavoura
Folha	366	36.62	9.13	54.24	BRS Bonança	363	0.72	18.40	80.88
Panícula	346	19.07	12.88	68.05	Primavera	349	0.37	9.47	90.19

^a População de *P. grisea* considerando folha e panícula.
^b População de *P. grisea* considerando cultivar Primavera e BRS Bonança.
^c Análise de variância obtida dos dados de virulência fenotípica.

A variabilidade dentro de cada lavoura foi elevada tanto para isolados de folhas (54,24%; $p > 0,00001$) quanto para isolados de panículas (68,05% $p > 0,00001$). Entre as lavouras plantadas com a mesma cultivar ocorreu uma pequena variação quanto a frequência de patótipos, para isolados de folha (9,13%) e para isolados de panícula (12,88%). Estes números indicam que o padrão de virulência fenotípica, tanto de isolados coletados em folha quanto em panícula, é semelhante, independente do local, distância e ano. Considerando-se isolados de folhas, as diferenças entre cultivares foi significativa (36,62%; $p > 0,00001$) enquanto que isolados de panículas apresentaram diferenças menores, embora significativas (19,07%; $p > 0,00001$).

Considerando as diferentes cultivares, a variabilidade fenotípica dos isolados de BRS Bonança e Primavera, foi de 80,88% e 90,19%, respectivamente, dentro de cada lavoura, indicando que a maior parte da variação total entre isolados provenientes de folha e panículas está presente dentro da lavoura (subpopulação) (Tabela 5). A variação fenotípica entre os isolados da cultivar BRS Bonança (18,40%) foi maior do que na população de isolados da cultivar Primavera (9,47%).

Tabela 5. Análise de variância da virulência fenotípica de populações de *Piricularia grisea* coletadas das cultivares de arroz BRS Bonança e Primavera¹.

Fonte de variação	G.L.	S.Q.	Componentes da variância	Varição (%)	P ¹
BRS Bonança (n = 363)					
Entre isolados de folha e panícula	1	483,237	0,03323	0,72	0,36755
Dentro de isolados de folha e panícula	6	250,703	0,84584	18,40	0,00001
Dentro de lavouras considerando isolados de folha e panícula.	355	1314,699	3,71790	80,88	0,00001
Total	362	1613,699	4,59697	-	-
BRS Primavera (n = 349)					
Entre isolados de folha e panícula	1	15,344	0,00916	0,37	0,36852
Dentro de isolados de folha e panícula	6	82,463	0,26029	9,47	0,00001
Dentro de lavouras considerando isolados de folha e panícula.	341	840,072	2,47781	90,19	0,00001
Total	348	937,879	2,74726	-	-

¹Probabilidade (P) de se obter uma estimativa do componente maior que o valor observado.

Nas populações compostas por isolados coletados de folhas e de panículas da cultivar BRS Bonança, a variação fenotípica foi maior (18,40%; $p > 0,00001$) quando comparada com a variação das mesmas populações isoladas da cultivar Primavera (9,47%; $p > 0,00001$) (Tabela 6). O padrão de virulência fenotípica dos isolados de folha é muito semelhante com os de panícula dentro de cada cultivar, demonstrada pela variação de apenas 0,72% ($p > 0,36755$) e de 0,37% ($p > 0,00001$) entre os grupos de folha e panícula, da cultivar BRS Bonança e Primavera, respectivamente.

Tabela 6. Distribuição hierárquica de diversidade gênica entre população de *Piricularia grisea* (estádio fenológico e cultivar) das cultivares BRS Bonança e Primavera.

Estádio fenológico*					Cultivar†				
Porcentagem de variação total‡					Porcentagem de variação total‡				
População	Tamanho da amostra	Entre cultivares	Entre lavouras dentro de cultivar	Dentro cultivares	População	Tamanho da amostra	Entre folha e panícula	Entre isolados de folha dentro da subpopulação e folha e panícula	Dentro de lavoura
Folha	299	39.44	24.34	36.22	BRS Bonança	267	-2.75	32.36	70.38
Panicula	239	10.27	25.00	64.92	Primavera	271	19.15	30.12	50.73

*População de *Magnaporthe grisea* considerando folha e panícula.
†População de *Magnaporthe grisea* considerando cultivar Primavera e BRS Bonança.
‡Análise de variância obtida dos dados de virulência fenotípica.

Variação genética

Foi feita uma análise molecular dos 267 isolados de *P. grisea* isolados da cultivar BRS Bonança e dos 271 isolados da cultivar Primavera baseando-se na ocorrência e distribuição de 5 a 13 fragmentos de DNA, obtidos por rep-PCR. A amplificação do DNA dos isolados da cv. BRS Bonança e da cv. Primavera gerou bandas variando entre 0,7 a 16 kb (Figura 2). O padrão de bandas amplificadas com o primer Pot 2 de 80 isolados de *P. grisea* encontra-se na Figura 2. O número de bandas variou entre 9 e 17, das quais de 8 a 16 foram polimórficas. Não houve uma diferença distinta entre os padrões de banda dos isolados obtidos de folha e panícula. A distribuição da diversidade genética entre as populações analisadas, de acordo com os resultados da AMOVA, mostraram que a maior parte da diversidade estava distribuída em campo, ou em cada subpopulação, independente da cultivar ou do local.

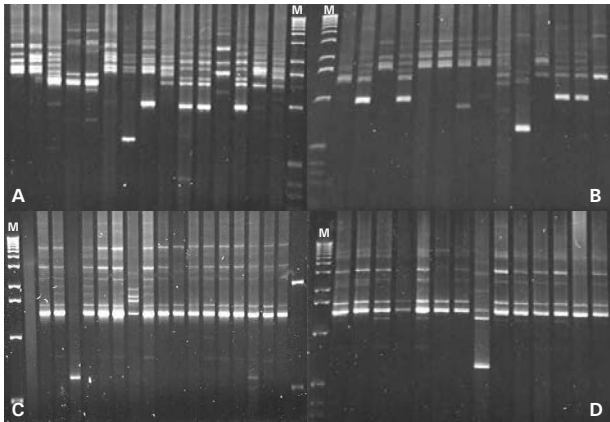


Fig. 2. Perfil eletroforético do DNA amplificado por rep-PCR de regiões repetidas *Pot 2* de alguns isolados monospóricos de *Piricularia grisea* provenientes de folhas (F) e panículas (P) das cultivares de arroz BRS Bonança (B) e Primavera (P). M = marcador Lambda 100bp (Invitrogen).

Considerando a população dos isolados da cv. BRS Bonança, a análise de diversidade indica que 70,38% do total da variação estava distribuída nos campos, independente de terem sido isolado de folhas ou panícula. A diferença entre as variações das subpopulações de folha e panícula não foram significativas.

Na diversidade estudada entre as subpopulações de isolados de folha e panícula de cv. Primavera houve diferença significativa (19,15%), indicando um padrão de bandas diferente para folha e panículas, independente do local geográfico.

Os resultados fenotípicos estão de acordo com os resultados da análise de variação genética no patossistema *Rhynchosporium secalis*– cevada, em lavouras na Austrália. Setenta e seis por cento da diversidade genética da população foi distribuída dentro do ponto de amostra numa lavoura, 19% entre pontos de amostras dentro de uma lavoura e somente 5% entre lavouras (MCDONALD et al., 1999). Os fungos *P. grisea* e *R. secalis* são semelhantes quanto ao modo de reprodução assexual, em ambos sabe-se que ainda não foram detectada a forma perfeita, em condições naturais no campo. Na Figura 2 observa-se que a estrutura da população revela que ambos apresentam elevada diversidade, o que indica que outros mecanismos como mutação seguida de reprodução parassexual e migração, através de uma disseminação eficiente dos conídios a longa distância, seja pelo vento e/ou por sementes infectadas estão atuando na população para permitir elevada variabilidade.

Conclusões

1. O patótipo brasileiro BD-16 foi o predominante nas lavouras da cultivar Primavera;
2. Os patótipos internacionais IB-41 e IB-9 foram os predominantes nas subpopulações de BRS Bonança e IF-1 nas populações de 'Primavera';
3. Houve um efeito da cultivar na estrutura da população de *P. grisea* quanto à virulência fenotípica;
4. Não houve alteração significativa do padrão de virulência dos isolados coletados seja das folhas ou das panículas, dentro de uma mesma lavoura;
5. A análise da diversidade genética indica que 70,38% e 50,73%, do total da diversidade está distribuída dentro da lavoura das cvs. BRS Bonança e Primavera, respectivamente, considerando os estádios de folha e panícula;
6. Foi observou-se uma migração dos isolados que ocorrem nas folhas para as panículas;

- 7 A recombinação entre os isolados constitui-se em um importante fator para explicar a estrutura de uma população de *P. grisea*;
- 8 Neste estudo observou-se uma maior variação expressiva dentro de cada subpopulação do que entre subpopulações formadas por isolados de folhas e anículas.

Referências

- ARAÚJO, L. G. de; PRABHU, A. S.; OLIVEIRA, C. F.; BERNI, R. F. Efeito da brusone nas panículas nos componentes de produtividade nas cultivares de arroz Primavera e BRS Bonança. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 30, n. 2, p. 265-270, abr./jun. 2004.
- BONMAN, J. M.; KHUSH, G. S.; NELSON, R. J. Breeding rice for resistance to pests. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 30, p. 507-528, 1992.
- CLIFFORD, H. T.; STEPHENSON, W. **An introduction to numerical classification**. London: Academic Press, 1975. 229 p.
- CORREA-VICTORIA, F. J.; ZEIGLER, R. S. Pathogenic variability in *Piricularia grisea* at a rice blast "hot-spot" breeding site in Eastern Colombia. **Plant Disease**, St. Paul, v. 77, n. 10, p. 1029-1035, Oct. 1993.
- DINIZ FILHO, J. A. F. **Análise de autocorrelação espacial**: inferências microevolutivas e aplicações em genética de populações. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1998. p. 83-145. (Série Monografias, 6).
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. J. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11-15, 1987.
- EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.; QUATRRO, J. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, Maryland, v. 131, n. 2, p. 479-491, Jun. 1992.
- FILIPPI, M. C.; PRABHU, A. S. Phenotypic virulence analysis of *Piricularia grisea* isolates from Brazilian upland rice cultivars. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 36, n. 1, p. 27-35, jan. 2001.
- GEORGE, M. L. C.; NELSON, R. J.; ZEIGLER, R. S.; LEUNG, H. Rapid population analysis of *Magnaporthe grisea* by using rep-PCR and endogenous repetitive DNA sequences. **Phytopathology**, St. Paul, v. 88, n. 3, p. 223-229, Mar. 1998.

HAMER, J. E. Molecular probes for rice blast disease. **Science**, Washington, v. 252, n. 5006, p. 632-633, May 1991.

HAN, S. S.; RA, D. S.; CHOI, S. H.; KIM, C. K. Populations dynamics of *Piricularia grisea* during leaf and panicle blast stages in the same field. **Korean Journal Plant Pathology**, Suwon, v. 13, p. 408-415, 1997.

INTERNATIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE. **Standard evaluation system for rice**. 3. ed. Los Baños, 1988. 54 p.

KACHROO, P.; LEONG, S. A.; CHATTOO, B. B. *Pot 2*, an inverted repeat transposon from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Molecular and General Genetics**, New York, v. 245, n. 3, p. 339-348, Nov. 1994.

KANG, S.; LEE, Y. Population structure and race variation of the rice blast fungus. **The Plant Pathology Journal**, Suwon, v. 16, n. 1, p. 1-8, 2000.

KIYOSAWA, S. Genetics and epidemiological modeling of breakdown of plant disease resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 20, p. 93-117, 1982.

KUMAR, J.; NELSON, R. J.; ZEIGLER, R. S. Population structure and dynamics of *Magnaporthe grisea* in the Indian Himalayas. **Genetics**, Maryland, v. 152, n. 3, p. 971-984, Jul. 1999.

LATTERELL, F. M.; TULLIS, E. C.; OTTEN, R. J.; GUBERNICK, A. Physiologic races of *Piricularia oryzae*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 44, p. 495-496, 1954. Abstract.

LEVY, M.; CORREA-VICTORIA, F. J.; ZEIGLER, R. S.; XU, S.; HAMER, J. E. Genetic diversity of the rice blast fungus in a disease nursery in Colombia. **Phytopathology**, St. Paul, v. 83, n. 12, p. 1427-1433, Dec. 1993.

LING, K. C.; OU, S. H. Standardization of the international race numbers of *Piricularia oryzae*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 59, n. 3, p. 339-342, 1969.

MCDONALD, B. A.; ZHAN, J.; BURDON, J. J. Genetic structure of *Rhynchosporium secalis* in Australia. **Phytopathology**, St. Paul, v. 89, n. 8, p. 636-645, Aug. 1999.

PARK, S. Y.; MILGROOMM, M. G.; HAN, S. S.; KANG, S.; LEE, Y. H. Diversity of pathotypes and DNA Fingerprint haplotypes in populations of *Magnaporthe grisea* in Korea over two decades. **Phytopathology**, St. Paul, v. 93, n. 11, p. 1378-1385, Nov. 2003.

PIELOU, E. C. **Ecological diversity**. New York: J. Wiley, 1975. 165 p.

PRABHU, A. S.; CASTRO, E. da M. de; ARAÚJO, L. G. de; BERNI, R. F. Resistance spectra of six elite breeding lines of upland rice to *Pyricularia grisea*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 38, n. 2, p. 203-210, fev. 2003.

PRABHU, A. S.; OLIVEIRA, C. F.; ARAÚJO, L. G.; BERNI, R. F. Determinação de danos potenciais em produtividade causada por brusone em arroz de terras altas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 27, p. S152, ago. 2002a. Suplemento, ref. 451. Edição dos Resumos do XXXV Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Recife, PE, ago. 2002.

PRABHU, A. S.; FILIPPI, M. C.; ARAÚJO, L. G. Pathotype diversity of *Pyricularia grisea* from improved upland rice cultivars in experimental plots. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 27, n. 5, p. 468-473, set./out. 2002b.

RATHOUR, R.; SINGH, B. M.; SHARMA, T. R.; CHAUHAN, R. S. Population structure of *Magnaporthe grisea* from North-western Himalayas and its implications for blast resistance breeding of rice. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 152, n. 5, p. 304-312, May 2004.

ROHLF, F. J. **NTSYS-pc**: numerical taxonomy and multivariate analysis system – version 1.80. New York: Exeter, 1993. Não paginado.

SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L. **Arlequin ver. 2001**: a software for population genetics data analysis. Geneva: Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, 2000.

SLATKIN, M. Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. **Evolution**, Lancaster, v. 47, n. 1, p. 264-279, Feb. 1993.

TENG, P. S. The epidemiological basis for blast management. In: ZEIGLER, R. S.; LEONG, S. A.; TENG, P. S. (Ed.). **Rice blast disease**. Wallingford: CAB Internacional, 1994. p. 409-433.